

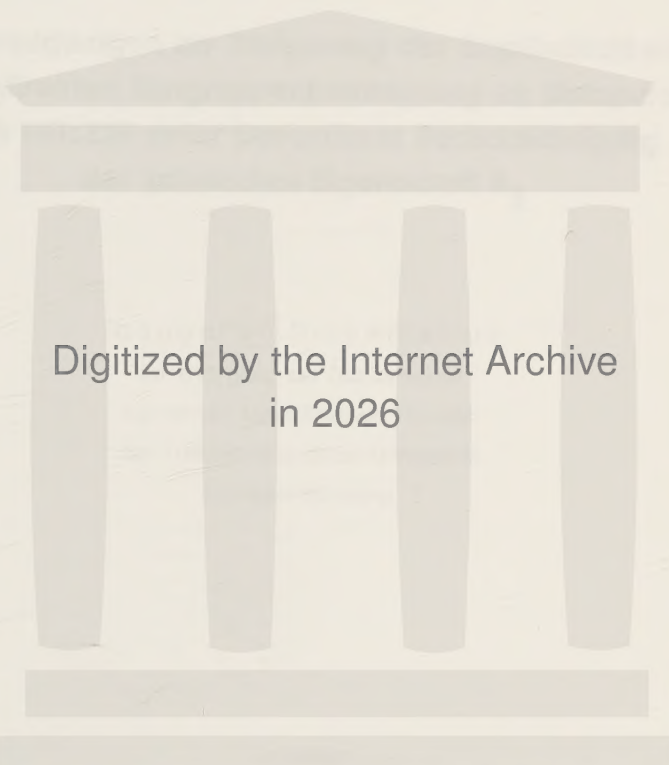
**Untersuchungen zur Steigerung der Empfindlichkeit
der indirekten Blutgruppenbestimmung an Blutspuren
nach HOLZER unter besonderer Berücksichtigung
der schwachen Eigenschaft A₂**

von

Leila Bactor

aus

Kairo/Ägypten



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. Dr. E. Weinig

**Untersuchungen zur Steigerung der Empfindlichkeit
der indirekten Blutgruppenbestimmung an Blutspuren
nach HOLZER unter besonderer Berücksichtigung
der schwachen Eigenschaft A₂**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Leila Bactor
aus
Kairo/Ägypten

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Professor Dr. G. K O C H

Referent: Professor Dr.Dr. E. W E I N I G

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 1972

	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1.	<u>Einleitung</u>	4
2.	<u>HOLZER'sche Absorptionsmethode</u>	4
2.1.	Originalverfahren nach HOLZER	4
2.2.	Abwandlungen der Methode durch andere Autoren	8
3.	<u>Eigene Untersuchungen</u>	12
3.1.	Im Institut angewendetes Routineverfahren	12
3.2.	Änderungen der Untersuchungsbedingungen	14
3.2.1.	Änderung der verwendeten Spuren-, Blutkörperchen- und Serummengen	14
3.2.2.	Einfluß der Reaktionsdauer und der Reaktionstemperatur auf den Versuchsablauf	15
3.2.3.	Lösungsversuche mit Säuren	15
3.2.4.	Lösungsversuche durch Zusatz von Rinderalbumin	15
3.2.5.	Lösungsversuche durch Zusatz von Heparin und Streptase	16
3.2.6.	Lösungsversuche durch Anwendung von Ultraschall	16
3.2.7.	Lösungsversuch durch mechanische Zerkleinerung des Spurenträgers	18
4.	<u>Versuchsergebnisse</u>	20
5.	<u>Diskussion</u>	21
6.	<u>Zusammenfassung</u>	22
7.	<u>Literatur</u>	23

1. Einleitung

Die von HOLZER angegebene Originalmethode ist im Laufe der Jahre verschiedentlich abgewandelt worden, um insbesondere bei älteren Spuren, eine ausreichende Titerreduktion des Antiserums zu erzielen. Das Ziel dieser Arbeit war, einmal die in der Literatur angegebenen Variationen teilweise nachzuarbeiten und zum anderen durch chemische, fermentchemische und physikalische Mittel eine bessere Löslichkeit des Spurenmaterials zu erreichen, die möglicherweise zur Erzielung einer verstärkten Titerreduktion beitragen könnte.

2. HOLZER'sche Absorptionsmethode

2.1. Originalverfahren nach HOLZER

Die als "ein einfaches Verfahren zur Gruppenbestimmung an vertrocknetem Blut durch Agglutininbindung" angegebene Methode beruht auf folgendem Prinzip:

- . Ein Serum der Gruppe O mit den Agglutininen α und β wird mit der Trockenblutspur unbekannter Gruppenzugehörigkeit zusammengebracht und später auf seinen noch vorhandenen Agglutiningehalt untersucht. Sind Agglutinine verbraucht, so war in der Blutspur das entsprechende Agglutininogen vorhanden.
- . Wird kein Agglutinin durch den Blutfleck gebunden, so agglutiniert das Serum O nach der Behandlung in unverminderter Stärke Blutkörperchen A und B. Ein Ergebnis, das beim Vorliegen der Blutgruppe O zu erwarten ist.

- Wird das Agglutinin Anti-A gebunden, so muß der Fleck die Blutkörpercheneigenschaft der A-Gruppe enthalten und damit dieser Gruppe angehören. Das Serum enthält nur noch das Agglutinin Anti-B und agglutiniert somit nur mehr Blutkörperchen B.
- Gehört die Spur der Gruppe B an, so wird das Anti-B gebunden, und nur Blutkörperchen A werden agglutiniert.
- Bei Vorliegen der Gruppe AB wird Anti-A und Anti-B gebunden. Dabei werden weder Blutkörperchen A noch B agglutiniert.

Die von HOLZER angegebenen Untersuchungsbedingungen sind folgende:

In Proberöhrchen von 6 cm Länge und 5-6 mm Lichtung werden 10 mg Trockenblut eingetragen. Handelt es sich um Blut, das an Textilien angetrocknet ist, so werden unter Auswahl gut blutdurchtränkter Stellen gleichfalls nur Mengen von 10 mg abgewogen und das Gewicht des Gewebes nicht berücksichtigt. Hernach werden die Röhrchen mit einem zuvor auf seinen Titer gegen A- und B-Blutkörperchen überprüften Serum mittels Rekordspritze beschickt. Die Anwendung der Spritze hat gegenüber dem Füllen mit der Messpipette den Vorteil rascheren Arbeitens. Sämtliche Röhrchen werden einmal kräftig geschüttelt und zunächst 24 Stunden kühl gestellt. Zur Untersuchung wird anschließend zentrifugiert und danach mit fein ausgezogenen Pipetten eine kleine Menge der Flüssigkeit zum Nachweis der etwa erfolgten Agglutininbindung entnommen. Das verwendete Antiserum sollte am besten so gewählt werden, daß seine α - und β -Agglutinine an-

nähernd gleiche Wertigkeit gegenüber den Probeblutkörperchen haben. Es können auch entsprechend hoch- und gleichwertige Anti-A und Anti-B - Seren getrennt Verwendung finden, wenn die Spur für die entsprechenden Ansätze ausreicht.

Das Wesentliche an dem Verfahren ist die Art der Bestimmung des Serumtiters und die Herstellung der dazu erforderlichen Verdünnungen. Die Auswertung wird auf Glasplatten mit 8 hohlgeschliffenen Vertiefungen vorgenommen. Die nach 2er Potenzen fortschreitende Verdünnung des Serums wird in den Näpfchen der Glasplatten hergestellt, indem in sämtliche Vertiefungen mit derselben fein ausgezogenen Pipette je 4 Tropfen physiologischer Kochsalzlösung gebracht werden. Nach Zugabe von 4 Tropfen des auszuwertenden Serums zur ersten Stufe, wird durch mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen unter gleichzeitigem Umrühren sorgfältig gemischt. Dann erfolgt die Titration durch Übertragen von 4 Tropfen in die nächste Mulde, wobei der Rest wieder der ersten Stufe beigegeben wird. So wird in gleicher Weise weiter verdünnt, bis in der 8. Vertiefung eine Verdünnung von 1 : 256 erreicht ist. Darauf werden aus jeder Stufe 2 Tropfen in die entsprechenden Vertiefungen einer zweiten Platte übertragen. Die eine Reihe dient zur Prüfung mit A-, die andere mit B-Blutkörperchen, von denen aus einer etwa 2%igen Aufschwemmung je 1 Tropfen zugefügt wird. Die erste Ablesung erfolgt nach 10 und die zweite nach 30 Minuten vom Zusatz der Probeblutkörperchen an gerechnet.

Bei der Endtiterbestimmung nach erfolgter Absorption von Spurenmaterial wird in gleicher Weise verfahren.

Es müssen selbstverständlich die gleichen Blutkörperchen verwendet werden, wie bei der Urtiterbestimmung, da Blutkörperchen ganz unterschiedliche Agglutinationsfähigkeit aufweisen können. Eine zu geringe Endausbeute zwingt zum Arbeiten mit halber Serummenge. Häufig bringt auch eine verlängerte Absorptionszeit im Eisschrank bis zu einigen Tagen ein besseres Ergebnis. Das bei jeder Versuchsreihe mitzuführende Kontrollserum soll den gleichen Bedingungen unterworfen werden, wie die Spurensätze, damit eine Titerreduktion aus anderer Ursache erkannt werden kann. Eine geringfügige Abnahme um höchstens eine Stufe, ist nicht als Beweis für eine Agglutininbindung anzusehen.

Die Untersuchungen wurden zunächst an Proben trockenen Blutes ausgeführt, deren Blutgruppe in frischem Zustand einwandfrei bestimmt worden war. Außerdem wurden Blutspuren, deren Blutgruppe an frischem Blut nicht bestimmt werden konnte, darunter auch solche bis zu einem Alter von 50 Jahren untersucht. Eine deutliche Abnahme des Bindungsvermögens bei diesen alten Spuren konnte nicht festgestellt werden.

Bei Arbeiten mit niedrigtitrigen Seren wird das Bindungsvermögen eines Trockenblutes häufig nicht voll ausgenutzt, entsprechend wird bei Anwendung höherwertiger Seren grössere Sicherheit bei der Deutung infolge höherer Titer senkung erreicht. Es empfiehlt sich also zur Agglutininbindung höherwertige Seren zu verwenden. Eine geringfügige Senkung des Titers berechtigt nicht zu einer positiven Aussage, besonders dann, wenn das andere Agglutinin tief abgesenkt wurde.

Der Vorteil der Methode besteht darin, daß sowohl sehr alte, als auch geringe Blutspuren bis zu 2 mg bestimmt werden können.

Von 387 Trockenblutproben, deren Gruppenzugehörigkeit an frischem Blut bestimmt worden war, konnten 366 auch im Agglutininbindungsverfahren bestimmt werden (94 %). HOLZER brauchte für 0,1 ccm Serum etwa 0,01 Gramm Trockenblut. Bei gepulvertem Trockenblut genügte ein Spurenanteil von 1/15 der Serummenge (0,02 g Blut auf 0,3 ccm Serum), um das Agglutinin fast vollständig zu erschöpfen.

2.2. Abwandlungen der Methode durch andere Autoren

Im Lauf der Zeit haben mehrere Autoren verschiedene Änderungen der Methode beschrieben. So führte STRASS-MANN statt der Glasplatten zur Titration die noch heute verwendeten Porzellanplatten mit 12 Vertiefungen ein. HALLAUER gab eine Extraktionsmethode an, bei deren Anwendung nach seinen Angaben Blutmengen von 1 - 10 mg noch erfolgreich untersucht werden können. Bei seinem Verfahren wird die Blutspur mit 5 - 10 ml Aqua dest. extrahiert. Nach Zugabe von einer gleich großen Menge 96 %igen Alkohols wird der Ansatz entweder 1/2 bis 1 Stunde gekocht oder 8 Stunden bei 56° C im Wasserbad gehalten. Nach Zentrifugieren und Filtrieren wird mittels Vakuumdestillation eingeeengt und der Extrakt auf schwache Anti-A und Anti-B-Seren einwirken gelassen. Die Testung mit A- und B-Blutkörperchen erfolgt in üblicher Weise.

KISHINO wusch bis zwei Tage alte Blutflecken zum Zweck der Entfernung etwa vorhandener Verunreinigungen 10 Minuten in fließendem Wasser. Ältere, 1 bis 2 Jahre alte Spuren beliess er vor der Absorption für 1 bis 2 Stunden in einer 0,3 - 0,5 %igen Trypsinlösung.

Die Variante von PONSOLD bestand darin, daß er die Titration der Ansätze in Kapillaren durchführte, wobei einerseits die erforderliche Trockenblutmenge auf 1 mg gesenkt werden und andererseits die Ablesung der letzten Stufe der Agglutination leichter erfolgen kann, als bei der Objektträger-Methode und beim Ansatz in SCHIFF'chen Röhrchen. Bei letzterem störe auch das erforderliche Zentrifugieren, da es hierdurch zur unspezifischen Agglutination kommen könne.

HAUSBRANDT bestätigte die von PONSOLD erarbeiteten Ergebnisse und wandelte die Methode so ab, daß er nach Bestimmung der günstigsten Verdünnungsstufe des Antiserums die Absorption durch die Spur in der Kapillare ablaufen ließ und dann ohne Titration zum Ergebnis gelangte, da die Titer Senkung wegen der optimalen Verdünnung des Serums eindeutig war. Bei Verwendung von etwa 6 mg Serum und 6-stündiger Absorption im Kühlschrank wurden nur 0,2 mg Trockenblut benötigt. Besonderer Wert wurde auf bestmögliche mechanische Zerkleinerung des Spurenmaterials gelegt. Als Verdünnung des Gebrauchsserums wurde diejenige gewählt, bei der noch in mindestens einer Stufe über der letzten kräftigen Agglutination Agglutinate vorhanden waren. In der Regel sollte das Verhältnis von Spurenmaterial zu Serum nicht unter 1 : 25 liegen. Die Agglutination erfolgte in der Kapillare, die Ablesung auf hohlgeschliffenen Objektträgern.

Für Untersuchungen zur Unterscheidung von A₁- und A₂-Spuren verwendeten HAUSBRANDT und JURKUWEIT ebenfalls Kapillarröhrchen, wobei sie nur die Absorption in der Kapillare ablaufen ließen, die Titration jedoch auf ausgehöhlten Glasplatten vornahmen.

FUNK und TOWSTIAK verwendeten Anti-A und Anti-B Seren getrennt zur Absorption, da, wie zuerst von LANDSTEINER und WITT beschrieben und von anderen Autoren bestätigt (z.B. MOUREAU, SCHLEYER, 1957), bei O-Serum eine Agglutinin-"Linkage", d.h. eine Titer senkung auch durch das heterologe Antigen hervorgerufen werden kann.

Die Absorption erfolgt zunächst in einer feuchten Kammer, dann bei Zimmertemperatur. Zur besseren Auflösung des Blutes und zur Verbesserung der Agglutination wird sodann ein Tropfen 11 %iges Rinderserum zugegeben und nach erneutem Stehenlassen in der feuchten Kammer die Titration vorgenommen. Es folgt die Zugabe 1 %iger Blutkörperchensuspensionen und Durchmischung auf dem Schüttelapparat. Ablesung der Agglutination nach 10, 20 und 30 Minuten. Die Verwendung 1 %iger Blutkörperchenaufschwemmungen soll die Agglutination um eine Verdünnungsstufe erhöhen.

Weitere Titrationsmethoden mit wechselnden Serumverdünnungen und verschiedenen Blutmengen wurden von DAHR und von HARLEY angegeben. Mit Fleckenextrakten arbeiteten HIGUCHI und auch von BROCKE.

Methoden ohne vergleichende Titration sind die von THERKELSEN und von WHITE. Beide Autoren verwendeten Blutstoff, den sie verdünntem Serum oder Plasma zugeben. KIND benutzte eine bereits von HIGUCHI angegebene

Methode, bei der Blutfleckenextrakt zu Verdünnungen von A- und B-Serum in gleicher Menge gegeben wurde, wobei KIND O-Serum verwendete. Durch Zugabe gleicher Mengen Fleckenextrakt zu den jeweiligen Serumverdünnungen ergebe sich eine logarithmisch mit der Serumverdünnung zunehmende Empfindlichkeit. SCHLEYER (1957) überprüfte diese Methode und stellte eine eindeutige Überlegenheit des HOLZER'schen Verfahrens fest.

LUKACI[✓] stellte Untersuchungen mit Ultraschallbehandlung von Seren und Blutkörperchen von 10 Minuten bis zu 5 Stunden an und fand, daß der Titer der Agglutinine und Agglutinogene mit zeitlicher Zunahme der Beschallung abnahm.

3. Eigene Untersuchungen:

3.1. Im Institut angewendetes Routineverfahren:

Spurenansatz:

2 - 3 Tropfen hoch- und gleichtitrigen Anti AB - Serums, das vorher auf einen Titer von 6 Stufen eingestellt wurde, werden mit dem Spurenmaterial (etwa 50 mg Trockensubstanz) versetzt. Der Ansatz wird mit einem Glasstab mehrmals verrührt und dann für 24 Stunden in den Kühlschrank bei 4 - 6° C verbracht. Vor der Titration erfolgt wiederum mit einem Glasstab ein nochmaliges Durchmischen des Ansatzes.

Verdünnungsreihe:

Auf Porzellantüpfelplatten mit 8 Vertiefungen in jeder Reihe wird in jede Vertiefung 1 Tropfen physiol. Kochsalzlösung eingebracht. In die erste Vertiefung von zwei untereinanderliegenden Reihen kommt je 1 Tropfen des Ansatzes.

Nach 3 - 4 maligem Durchmischen wird in jeder Reihe eine steigende Verdünnung durch jeweiliges Über-titrieren eines Tropfens des Gemisches hergestellt. Die erste Reihe dient der Prüfung auf die α -Agglutinine, die zweite der auf die β -Agglutinine. Werden die α -Agglutinine mit A_1 und A_2 Blutkörperchen getestet, muß noch eine dritte Reihe austitriert werden.

Der Ansatz der Kontrollen, nämlich der Serumleerkontrolle und der Textilkontrolle an unbeflecktem Material erfolgt in gleicher Weise.

Blutkörperchenaufschwemmung:

Die A- und B-Blutkörperchen sollen nicht älter als 4-5 Tage sein und werden nach 2-3 maligem Waschen in NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung soll so dünn sein, daß sie gegen Licht einen schlierenartigen Perlmuttglanz aufweist. Je ein Tropfen der Blutkörperchensuspensionen wird in die entsprechenden Vertiefungen der Ansätze gebracht, wobei in der 8. Stufe eine Verdünnung von 1 : 256 entsteht.

Nach Durchmischen der fertigen Ansätze mit einem Glasstab von rechts nach links, also von der stärksten Verdünnung ausgehend, wird die Agglutination während 15 Minuten abgewartet. Nach Zusammenschütteln der Agglutinate durch Rotation der Platten und weiterem Stehenlassen für 10 Minuten wird das Ergebnis abgelesen.

Auswertung:

Die Ablesung erfolgt in der Weise, daß große Agglutinate mit +++, kleinere mit ++ und kleine mit + bezeichnet werden. Bei schwacher oder sehr schwacher Agglutination werden die Zeichen $\frac{+}{-}$ und $\frac{+}{=}$ verwendet.

Als beweisend für eine stattgefundene Agglutininbindung werden Titerreduktionen von 3 Stufen und mehr gegenüber den Kontrollen angesehen.

Die Relevanz der Ergebnisse hängt wesentlich von der gleichmäßigen Tröpfchengröße insbesondere bei den Titrationsvorgängen ab.

3.2. Änderungen der Untersuchungsbedingungen:

Ohne Berücksichtigung des Spurenalters wurden neben der Veränderung der zum Absorptionsverfahren herangezogenen Spuren-, Blutkörperchen- und Serummengen auch der Einfluß der Reaktionsdauer und -temperatur, verschiedene Lösungsbedingungen für das Trockenblut und mechanische Zerkleinerungsverfahren in die Untersuchungen einbezogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind mit denen in Beziehung gesetzt worden, die bei Anwendung der im Institut üblichen Methodik gewonnen wurden.

3.2.1 Änderung der verwendeten Spuren-, Blutkörperchen- und Serummengen

Trotz der in der Literatur angegebenen gegenteiligen Erfahrungen versuchten auch wir durch Einsatz von mehr Fleckenmaterial und damit größeren Agglutininmengen ein günstigeres Ergebnis bei der Absorption zu erzielen. Die Ansätze wurden nach 6, 18 und 24 Stunden gegen A_2 und A_1 Blutkörperchen titriert. Es ergaben sich keine besseren Absorptionstiters.

Auch die Verwendung von 0,5, 0,2 und 0,05 %igen Blutkörperchensuspensionen erbrachte kein besseres Absorptionsergebnis. Bei den Versuchen die Spuren erst nach kürzerer oder längerer Lösungszeit in physiologischer Kochsalzlösung zu absorbieren konnte der Endtiter gegenüber der Normalmethode ebenfalls nicht abgesenkt werden.

3.2.2 Einfluß der Reaktionsdauer und der Reaktions- temperatur auf den Versuchsablauf

Die Titration nach Absorption des Serums in der Kälte zeigte weder nach 12, 24 oder 48 Stunden andere Ergebnisse als Ansätze, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden waren.

3.2.3 Lösungsversuche mit Säuren

Anti-AB-Serum wurde 1:1 mit 1 %iger Essigsäure verdünnt. Die Kontrollversuche erfolgten mit Serum, das mit NaCl-Lösung 1:1 verdünnt worden war. Es ergab sich keine stärkere Titerreduktion der Essigsäureansätze gegenüber denen mit NaCl-Lösung. Die Reaktionszeiten betrugen 2 und 48 Stunden.

3.2.4 Lösungsversuche durch Zusatz von Rinderalbumin

Nach der Mitteilung von FUNK und TOWSTIAK sollte Rinderalbumin zur besseren Löslichkeit des Spurenmaterials beitragen. Deshalb wurden 2 Tropfen unverdünntes Rinderalbumin und etwa 50 mg Blutfleckenmaterial angesetzt. Nach 3, 6 und 12 Stunden wurde den Ansätzen jeweils ein Tropfen entnommen und mit 2 Tropfen Anti-AB-Serum gemischt. Die Ansätze wurden zur Reaktion mit dem Serum im Kühlschrank gehalten und danach zusammen mit Parallelansätzen der Originalmethode titriert. Hierbei trat eine gering verstärkte Titerreduktion bei den mit Rinderalbumin vorgelösten Spuren ein.

3.2.2. Trennungsergebnisse durch Zusatz von Heparin und Streptase

Der Zusatz von Heparin Novo und Streptase zum Serum im Verhältnis 2 : 3 vermochte die Spur zwar eindeutig vom Textilmaterial zu lösen, ergab dennoch kein zufriedenstellendes Titrationsergebnis. Kontrollen mit den Antikoagulantien zeigten, daß keine unspezifische Adsorption stattfand.

3.2.3. Trennungsergebnisse durch Anwendung von Ultraschall

Die Beschallung der Blutspuren wurde in Anlehnung an L. Müller, der Titeruntersuchungen an Seren und Blutklüppern vorgenommen hatte, mit verschiedenen Frequenzen durchgeführt. Hierdurch sollte eine größere Ausbeute an Spurenmaterial erzielt werden.

In einem Ultraschall-Reinigungsgerät der hiesigen Zahnklinik, welches eine Frequenz von 80 kHz bei einem Wellenberg von etwa 1 mm aufweist, wurden Ansätze von Spurenmaterial mit 2 Tropfen Kochsalzlösung 1, 2, 4, 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten lang beschallt. Die Temperatur der Kopplungsflüssigkeit Wasser stieg hierbei bis maximal 56° C. Nach der Beschallung gaben wir 4 Tropfen Serum hinzu und titrierten die Proben nach 24 Stunden aus. Obwohl eine vollständige Entfärbung des Trägerstoffes eingetreten war und somit angenommen werden konnte, daß das Blut durch die Beschallung weitestgehend gelöst wurde, zeigten sich bei der Untersuchung keine wesentlichen Unterschiede zu den Kontrollansätzen.

Das Ultraschallgerät des hiesigen Isotopenlabors hat eine Frequenz von 40 kHz, eine Intensität von 60-240 kw und einstellbare Resonanz. Als Koppungsflüssigkeit dient Wasser. Zunächst wurden 2 Versuchsreihen parallel angelegt, wobei die 1. Reihe mit der Blutspur und 2 Tropfen NaCl und unterschiedlicher Beschallungszeit (30', 15', 5') angesetzt wurde; bei der 2. Reihe dagegen behandelten wir die Spur mit Aqua dest. und mit der gleichen Beschallungszeit wie im 1. Versuch. Nach der Beschallung fügten wir allen Ansätzen 4 Tropfen Serum hinzu. Die Auswertung ergab abermals keine Verbesserung gegenüber den Kontrollen.

Bei einem weiteren Versuch wurden Spuren verschiedenen Alters gleich nach dem Ansetzen mit NaCl und Serum im Verhältnis 1:1 jeweils für 30 und 15 Minuten beschallt. Ein Reagenzglas mit reinem Serum wurde parallel hierzu beschallt, um den Einfluß der Schallwellen zu untersuchen. Der Seramtiter reduzierte sich geringfügig um 1 Stufe. Zunächst schien dieses Verfahren mit alten Spuren (über 50 Tage) ein verwertbares Resultat zu ergeben. Wiederholte Versuche bestätigten dieses Ergebnis jedoch nicht.

Als weiteres Versuchsserum wurde das HYLAND-Serum aus Los Angeles angewendet. Es zeigte bei konstanten Spurgrößen und verschiedener Beschallungsdauer zunächst eine leicht positive Titerreduktion zwischen den Beschallungszeiten von 15' - 25' bei A₂-Blutspuren. Der wiederholte Versuch mit gezielter Beschallungsdauer von 20' und 25' mit A₁-, A₂B und B-Blutspuren bestätigte das erste Resultat nicht.

3.2.7 Lösungsversuch durch mechanische Zerkleinerung des Spurenträgers

Bei diesem Versuch wurde die Spur mit Hilfe eines Mörsers mechanisch zerkleinert. Zuvor wurde dem Stoff gesiebter Seesand (Siebgröße: Monodur Mühlensieb 200) beigelegt. Das so erhaltene Pulver wurde zum Ansatz verwendet, mit 4 Tr. des mit NaCl zu 50 % verdünnten Serums versetzt und 24 Stunden lang kühl gelagert. Auch durch diese Versuchsanordnung wurde keine verstärkte Titerreduktion erreicht.

In folgender Tabelle ist ein Überblick über die gesamten Lösungsversuche an Blutspuren gegeben.

Tabelle:

<u>Serumverdünnung</u>	<u>Alter der Spuren</u>
Frisches Anti-AB- Blutspender-Serum	
unverdünnt	2 Tage
1 : 1 NaCl	3 Tage
unverdünnt	9 Tage
1 : 1 NaCl	9 Tage
1 : 1 NaCl	17 Tage
1 : 1 NaCl	23 Tage
1 : 1 Essigsäure	38 Tage
1 : 1 NaCl	44 Tage
1 : 1 Essigsäure	44 Tage
3 : 2 Rinderalbumin	60 Tage
3 : 2 Rinderalbumin	67 Tage
3 : 1 Aqua dest.	74 Tage
1 : 1 NaCl	81 Tage

1 : 1 NaCl	88 Tage
1 : 2 NaCl	88 Tage
1 : 4 NaCl	88 Tage
unverdünnt	88 Tage
1 : 1 NaCl	95 Tage
1 : 1 NaCl, Blkp. 0,5 %	100 Tage
1 : 1 NaCl, Blkp. 0,2 %	100 Tage
1 : 1 NaCl, Blkp. 0,05 %	100 Tage
unverdünnt Blkp. 0,05 %	100 Tage

Anti-AB-Serum HYLAND

2 : 1 NaCl mit Beschallung	193 Tage
2 : 1 NaCl mit Beschallung	210 Tage
2 : 1 NaCl mit Beschallung	207 Tage
2 : 1 NaCl mit Beschallung	215 Tage
2 : 1 Aqua dest. mit Beschallung	215 Tage
1 : 1 NaCl mit Beschallung	221 Tage
1 : 1 NaCl mit Beschallung	5 Tage
2 : 1 NaCl mit Beschallung	55 Tage
3 : 2 Streptase	62 Tage
1 : 1 NaCl mit Beschallung	174 Tage
2 : 1 NaCl mit Beschallung	189 Tage
2 : 1 NaCl mit Beschallung	193 Tage
2 : 1 NaCl mit Beschallung	209 Tage
2 : 1 NaCl mit Beschallung	217 Tage
2 : 1 NaCl mit Beschallung	224 Tage
2 : 1 NaCl mit Seesand zermahlen	231 Tage

4. Versuchsergebnisse:

A₂B-Blutspuren mit sehr schwacher Eigenschaft A₂ wurden in 175 Einzelansätzen mit entsprechenden Kontrollen nach dem Verfahren von HOLZER und mehreren Abänderungen dieser Methode bis zu einem Spurenalter von 231 Tagen auf ihre Blutgruppeneigenschaften untersucht. Das Spurenmaterial befand sich auf Leinenstoff als Spurenräger. Die Versuche nach der HOLZER'schen Methode wurden mit so stark verdünntem Serum durchgeführt, daß der Titer gegen A₁ und A₂-Blutkörperchen zwischen 4 und 3 Stufen lag. Die Testblutkörperchenkonzentration für A₁ und A₂ betrug etwa 2,0 %. Die Ansätze wurden 24 Stunden bei Kühlschranktemperatur stehengelassen. Als positive Ergebnisse wurden diejenigen gewertet, bei denen die Titerreaktion bei A₁ oder A₂ mindestens 3 Stufen betrug.

Positive Ergebnisse wurden nach der Originalmethode bis zu einem Spurenalter von 174 Tagen beobachtet. Die daneben laufenden Versuche mit abgewandelter Methodik lieferten mit Ausnahme der Ansätze mit Rinderalbumin bei 67 Tage alten Spuren kein besseres Ergebnis. Bei der Vorlösung der Spur mit Rinderalbumin betrugen die Titerreduktionen für A₁-Blutkörperchen 4 und für A₂-Blutkörperchen 5 Stufen. Die 5, 55 und 174 - 231 Tage alten Spuren zeigten nach Beschallung unter verschiedenen Bedingungen keine besseren Ergebnisse, als die mit der Originalmethode erzielten. Für die ganz alten Spuren von 174 - 231 Tagen konnten auch mit der normalen Methode keine verwertbaren Titerreduktionen erreicht werden.

Auch das Zermahlen der Spuren mit Seesand hatte bei einem Spurenalter von 231 Tagen keinen Einfluß auf den negativen Ausgang der Titration.

Die Titerreduktion bei B war bis zu hohen Spurenaltern ausreichend.

5. Diskussion

Die im wesentlichen auf bessere Löslichkeit der Blutspuren angelegten Versuche haben ergeben, daß weder durch chemische, noch durch physikalische Verfahren bei schwachen A_2 -Spuren eine verstärkte Titerreduktion zu erreichen ist.

Die Lösungsversuche mit Ultraschall und durch Verreiben der Spuren mit Seesand führten zu einem völligen Herauslösen des Blutfarbstoffes aus dem Spureenträger. Dennoch konnte an diesem Material nur eine schwächere Titerreduktion erzielt werden, als bei Parallelversuchen mit der Originalmethode. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Feststellungen von THERKELSEN und SCHLEYER (1966), die bei vergleichenden Untersuchungen mit Fleckenextrakten und nicht extrahiertem Fleckenmaterial nachgewiesen hatten, daß weniger die absolute Menge an herausgelöstem Antigen für den Umfang der Titerreduktion von Bedeutung ist, als vielmehr seine Haftung an dem Fleckenstoff.

Mit zunehmendem Spurenalter unterliegen offenbar die Antigene in den Blutflecken biochemischen Veränderungen, die eine Blutgruppenbestimmung unabhängig von der Löslichkeit unmöglich machen.

Eine verstärkte Titerreduktion konnte bei Spuren erzielt werden, die mit Serum angesetzt wurden, das statt mit physiologischer Kochsalzlösung mit Rinderalbumin verdünnt wurde. Offenbar kommt bei diesem Vorgehen eine Schutzwirkung des Kolloids zum Tragen.

5. Ergebnisse

Im Gegensatz zu den im 191 Tagen alten Blutspuren der Gruppe A_2B mit sehr schwacher Eigenschaft A_2 lassen ergeben, daß weiter durch chemische noch durch physikalische Umwandlungen ein der alten HOLZER'schen Methode der indirekten Blutgruppenbestimmung überlegenes Verfahren entwickelt werden konnte.

Es hat sich gezeigt, daß die Ergebnisse unabhängig von Grad der Herauslösung des Spurenmaterials aus den Spurenträger sind und daß im Gegenteil die noch im Textilgewebe verankerten Spuren stärkere Titerreduktionen ermöglichen.

In Anbetracht des vor allem schon durch extrem lange Lagerung veränderten Spuren der Ansatz mit Serum, das mit Sinteralbumin verdünnt wurde. Hierdurch konnte eine geringe Steigerung der Titerreduktion erreicht werden.

Literaturverzeichnis

1. BROCKE, I. v.
Zur Diagnostik der Blutgruppe aus nahezu
ausgewaschenen Blutflecken.
Kriminalwissenschaft in Kriminalistik 8, 124 (1954)
2. DAHR, P.
Die Technik der Blutgruppen- und Blutfaktoren-
bestimmung.
Georg Thieme, Stuttgart 1940
3. FUNK, H.J. und W. TOWSTIAK
A practical method for detecting ABO agglutinins
and agglutinogens in dried bloodstains.
J. Forensic Sci. 10, 455 (1965)
4. HALLAUER, C.
Beitrag zur Blutgruppenbestimmung kleiner
Mengen menschlichen Trockenblutes.
Dt. Zschr. ges. gerichtl. Med. 23, 206 (1934)
5. HARLEY, D.
Medico-Legal blood group determination.
London (Heinemann) 1944
zit. nach SCHLEYER (1966)
6. HAUSBRANDT, F.
Blutgruppenbestimmung an kleinsten Trockenblut-
mengen durch Agglutininbindung in Capillaren.
Dt. Zschr. ges. gerichtl. Med. 29, 501 (1938)

7. HAUSBRANDT, F., A. JURKUWEIT
Untersuchungen zur Untergruppenbestimmung
(A₁ und A₂) an Trockenblut.
Dt. Zschr. ges. gerichtl. Med. 45, 355 (1956)
8. HIGUCHI, S.
Über den Nachweis der 4 menschlichen Blut-
gruppen in Blutflecken.
Z. Immun. Forsch. 60, 246 (1929)
9. HOLZER, F.J.
Blutgruppenbestimmung an vertrocknetem Blut
durch Agglutininbindung.
Dt. Zschr. ges. gerichtl. Med. 16, 445 (1931)
10. KIND, S.S.
A modified absorption technique determining
the ABO group of bloodstains.
Vox Sang 2, 15 (1955)
11. KISHINO, H.
Contributions to the blood grouping method of
blood stains, body fluids and excretes.
Part II. Preliminary treatment of blood stains
in determining their group.
Shikoku Acta medica 7, 189 (1955)
12. KISHINO, H.
Contributions to the blood grouping method of
blood stains, body fluids and excretes.
Part III. Blood grouping from urine and
urinary stains.
Shikoku Acta medica 7, 267 (1955)

13. LANDSTEINER, K., D. WITT
Observations on the Human Blood Groups.
Irregular Reactions.
J. Immunol. 2, 221 (1926)
14. LUKAČI, J.
Der Einfluß des Ultraschalls auf die
Blutgruppeneigenschaften.
Soudni lék. 5, 59 (1961)
15. MOUREAU, P.
Determination of Blood Groups in Blood Stains.
Methods of Forensic Science Band 3
Interscience, London-New York, 1963
16. PONSOLD, A.
Das Mengenverhältnis der Absorptionsblut-
körperchen zu dem zu absorbierenden Serum
als Ausdruck der Rezeptorstärke.
Dt. Zsch. ges. gerichtl. Med. 30, 136 (1938)
17. SCHLEYER, F.
Vergleichende Untersuchungen über den optimalen
Nachweis von ABO - Agglutininen in Blutflecken.
Z. Immun. Forsch. 114, 244 (1957)
18. SCHLEYER, F.
Leitfaden der gerichtlich-medizinischen
Blutspurenuntersuchung,
Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck 1966

19. STRASSMANN, F.
Die Blutfleckenbestimmung an Blutflecken.
Dt. Zschr. ges. gerichtl. Med. 19, 302 (1932)
20. THERKELSEN, F.
Typenbestimmung bei gerichtsmedizinischen
Fleckenuntersuchungen.
Z. Rassenphysiologie 8, 98 (1936); 2, 1, (1937)
21. WHITE, J.
Application of blood grouping in the
examination of blood stains.
J. Forensic Med. 1, 333, (1954)

An dieser Stelle erlaube ich mir, Herrn Professor Dr. Dr. E. Weinig für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Cheflabor seines Instituts, meinen innigsten Dank auszusprechen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Schaidt für die freundliche Unterstützung, vor allem aber für die zahlreichen Anregungen, die zur Abfassung dieser Arbeit ganz wesentlich beigetragen haben.

Lebenslauf

Am 30. November 1945 wurde ich als Tochter des ägyptischen Lungenchirurgen Dr. Helmy Bector und seiner deutschen Ehefrau Johanna, geborene Jacob, in Kairo/Ägypten geboren. Mein Vater ist 1961 einem Herzinfarkt erlegen.

Von 1951 an besuchte ich bis zum Abschluss der "Mittleren Reife" im Jahre 1961, die deutsche Schwesternschule des Hl. Borromäus. An der Deutschen Evangelischen Oberschule in Kairo, legte ich im Jahre 1964 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1964/65 nahm ich an der "Ain Shams" - Universität, Kairo, das Studium der Medizin auf und legte im Sommersemester 1967 das Physikum in englischer Sprache ab. Nach zwei anschließenden klinischen Semestern an der gleichen Fakultät bot sich eine günstige Gelegenheit, zumal meine Schwester gerade das Abitur bestanden hatte, nach Deutschland überzusiedeln. Wir ließen uns im Oktober 1968 in Erlangen nieder. Das in Ägypten abgelegte Physikum wurde durch eine vom Bayerischen Kultusministerium angeordnete Kolloquiumsprüfung im Februar 1969 bestätigt und anerkannt, und ich konnte mein Studium in Erlangen mit den klinischen Semestern fortsetzen und mit dem Staatsexamen abschließen.

Am 8. Februar 1972 habe ich das Staatsexamen an der Friedrich - Alexander - Universität, Erlangen-Nürnberg mit Erfolg bestanden. Die Promotion fand am 22.2.1972 statt.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990